

09 / 807400
PCT/JP99/05673

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

14.10.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年10月15日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第292697号

出願人
Applicant(s):

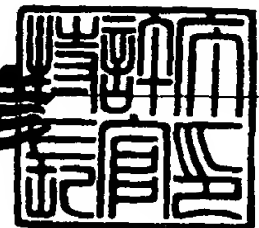
堀内 嵩
協和醗酵工業株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月19日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3079358

【書類名】 特許願

【整理番号】 H10-1381Q3

【提出日】 平成10年10月15日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 外来遺伝子の増幅方法

【請求項の数】 20

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県岡崎市戸崎町藤挟 20-4

 【氏名】 堀内 嵩

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県岡崎市竜美南 2-3-1 竜美ヶ岡公務員宿舎 6-104

 【氏名】 小林 武彦

【特許出願人】

 【住所又は居所】 愛知県岡崎市戸崎町藤挟 20-4

 【氏名又は名称】 堀内 嵩

【特許出願人】

 【識別番号】 000001029

 【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

 【代表者】 平田 正

【代理人】

 【識別番号】 100106574

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 岩橋 和幸

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 008187

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9505334

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 外来遺伝子の増幅方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 組換えのホットスポット領域および自律複製配列を、組換え導入された外来遺伝子に近接して配置し、複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質を存在させることにより、外来遺伝子を増幅させる方法。

【請求項 2】 外来遺伝子に近接して配置する位置が、外来遺伝子の上流および／または下流の位置である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 組換えのホットスポット領域が、HOT1由来のホットスポット領域である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】 組換えのホットスポット領域が、複製フォークの進行を阻害する領域 (Replication Fork Blocking; RFB) からなる、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 5】 組換えのホットスポット領域が、DNA複製終結部 (DNA Replication terminus; Ter) からなる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】 複製フォークの進行を阻害する活性を含む蛋白質が配列番号 25 または 26 記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】 配列番号 25 または 26 記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質。

【請求項 8】 請求項 7 記載の蛋白質をコードする DNA。

【請求項 9】 請求項 8 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質をコードする DNA。

【請求項 10】 配列番号 27 または 28 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ複製フォークの進行を阻害する活性を有する

蛋白質をコードするDNA。

【請求項11】 請求項8～10のいずれか1項に記載のDNAをベクターに組み込んで得られる、該DNAのコードする蛋白質を発現することのできる組換えベクター。

【請求項12】 外来遺伝子発現用ベクターにおいて、組換えのホットスポット領域および自動複製配列を、組換え導入された該外来遺伝子に近接して配置して得られる外来遺伝子増幅用ベクター。

【請求項13】 外来遺伝子に近接して配置する位置が、外来遺伝子の上流および／または下流の位置である、請求項12記載の外来遺伝子増幅用ベクター。

【請求項14】 組換えのホットスポット領域が、HOT1由来のホットスポット領域である、請求項12記載の外来遺伝子増幅用ベクター。

【請求項15】 組換えのホットスポット領域が、複製フォークの進行を阻害する領域 (Replication Fork Brocking;RFB) からなる、請求項12または13記載の外来遺伝子増幅用ベクター。

【請求項16】 組換えのホットスポット領域が、DNA複製終結部 (DNA Replication terminus;Ter) からなる、請求項12記載の外来遺伝子増幅用ベクター。

【請求項17】 請求項8～10記載のいずれか1項より選ばれたDNAを組み込んでなる、請求項12～16のいずれか1項に記載の外来遺伝子増幅用ベクター。

【請求項18】 請求項12～17のいずれかに記載のベクターより選ばれたベクターを1つ以上宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

【請求項19】 請求項18記載の形質転換体を用いた外来遺伝子を増幅させる方法。

【請求項20】 請求項18記載の形質転換体を用いた、外来遺伝子にコードされた蛋白質の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、組換え導入された外来遺伝子を増幅させる方法および該方法により増幅された外来遺伝子を用い、外来遺伝子にコードされた蛋白質を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

真核細胞における遺伝子増幅の現象として、c-myc、N-mycなどガン遺伝子の腫瘍増殖に伴う増幅 [Nature, 299, 61, (1982); Cell, 35, 359 (1983); Nature, 305, 245, (1983)] や、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dihydrofolate reductase; dhfr) 遺伝子の、葉酸アナログであるメトトレキサート (Methotrexate; MTX) 存在下での濃度依存的コピー数の増加などが知られている [Cold Spring Harbor Symp. Quant., Vol. XLII, 649 (1978)]。

【0003】

動物細胞宿主における遺伝子増幅法として一般的に用いられているMTX-dhfr系は、上述の現象を用いたものである。しかし、MTX-dhfr系は、遺伝子導入細胞を選択後、徐々にMTX濃度を上昇させ、遺伝子増幅した細胞を育種、選択するため時間がかかること、高濃度のMTX存在下で生育可能な細胞の中には、MTXの排出向上や不活化など導入遺伝子の増幅によるものではない細胞も混在しているため、遺伝子増幅効果が一定しないこと、また、MTXに対する感受性は細胞により異なるために、宿主として使える細胞が限定されていることなどの多くの欠点がある。さらに、c-myc等のガン遺伝子を遺伝子増幅に用いることは、物質生産を目的とする細胞培養系には安全性上好ましくないと考えられる。

【0004】

ところで、リボソームRNA (以下、rRNAと略す) 遺伝子は大部分の真核生物の染色体上で繰り返し構造をとっており、以下に示す種々の増幅現象が見出されている。ショウジョウバエやアカパンカビのrRNA遺伝子の繰り返し構造を部分的に欠損させた変異株においては、増殖に伴い、もとのコピー数に回復することが見出されている [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 509 (1968); Chromosoma, 93, 337 (1986)]。また、アフリカツメガエルの卵の成熟過程において、rRNA遺伝

子が、最初の450コピーから1500倍に増加することが知られている [Science, 160, 272 (1986)]。また、rRNA遺伝子以外でも、ニワトリのアクチン遺伝子のコピー数が、初期の筋発生段階で増加することも見出されている [Gene Amplification, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982)]。このように、正常な生物の発生、生育、再生等において、遺伝子の増幅現象が見出されているが、そのメカニズムは、あまり解明されていない。

【0005】

上記のような生物現象としての遺伝子増幅では、増幅が非常に長大であり、増幅する遺伝子ユニットに複製開始点が含まれる必要があると考えられている。実際、dhfrやc-mycのように増幅することが知られている遺伝子にも、複製開始点が見出されている [DNA Replication in Eukaryotic Cells, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)]。また染色体上で遺伝子の増幅が大量に行なわれるためには、遺伝子の組換えも効率よく行われる必要があり、染色体上にDNA組換えのホットスポットが必要であると考えられている。

【0006】

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) において、rRNA遺伝子は、第12番染色体上に約150コピーのタンデムの繰り返し構造で存在する。 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 410 (1979)]。一つの繰り返しユニットは、図1に示すように、35Sと5Sの二つのrRNA遺伝子と、二つの非転写スペーサー領域 (NTS1、NTS2) からなる。35S rRNA遺伝子の転写はRNAポリメラーゼIによって、また5SのrRNA遺伝子の転写は、RNAポリメラーゼIIIによって、それぞれ特異的に行われる。複製開始点を含む自律複製配列 (autonomously replicating sequence; ARS) はNTS2に存在する [Nucl. Acids Res., 12, 2955 (1988); Mol. Cell. Biol., 8, 4927 (1988)]。rRNA遺伝子の繰り返しユニットのBglIII断片は、近傍遺伝子の相同性組換えの促進活性を有しており、組換えのホットスポットと考えられている。該断片部位は、HOT1と命名されている [Cell, 39, 377 (1984)]。

【0007】

また、HOT1には、35S rRNAの転写に必要な領域である二つの領域、NTS1内のエンハンサーを含むE-elementと呼ばれる領域 [Cell, 39, 663 (1984); Mol. Cell

. Biol., 13, 1283 (1993)] とNTS2中の35S rRNA遺伝子の転写開始点を含むI-elementと呼ばれる領域 [Cell, 48, 1071 (1987)] が含まれており、またRNAポリメラーゼ I はHOT1において近傍遺伝子の相同組換え頻度を促進させる活性に必須であることが報告されている [Genetics, 141, 845 (1995)]。

【0008】

rRNA遺伝子の繰り返しユニットには、複製開始点からの複製フォークの進行を一方向からだけ（図1では右のARSから左方向に進行する複製フォーク）阻止する複製フォーク阻害 (replication fork blocking; RFB)領域が存在する [Mol. Gen. Genet., 233, 355 (1992); Cell, 71, 267, (1992)]。RFB部位は、約100残基の特異的配列からなり、NTS1中のE-elementと重なる領域に存在する [Mol. Cell. Biol., 8, 4927 (1988); Cell, 55, 637 (1988); Mol. Gen. Genet., 233, 355 (1992); Cell, 71, 267 (1992)]。このことから、複製フォーク阻害とHOT1における近傍遺伝子の相同組換え頻度を促進させる活性の関係を調べるため、酵母のHOT1における近傍遺伝子の相同組換え頻度を促進させる活性が欠損した変異株がスクリーニングされ、RFB部位における複製フォーク阻害活性とHOT1における近傍遺伝子の相同組換え頻度を促進させる活性が同時に失活したfob1-4株が見出された。

【0009】

fob1-4株を用い、これら株が喪失している両方の活性を共に補完できる遺伝子としてFOB1遺伝子が取得された。

FOB1遺伝子は、第4染色体に存在する配列番号25記載の566アミノ酸からなる蛋白質をコードする遺伝子で、生育に必須ではない。またDNAデータベース中に、現在までのところFOB1遺伝子と相同性のある遺伝子は見出されていない [Genes to Cells, 1, 465 (1996)]。

FOB1遺伝子による、上記活性に対する作用メカニズムは知られていない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

遺伝子組換えによる蛋白質の生産性を向上させるため、増幅遺伝子を安定に保持し、導入遺伝子を安全かつ確実に多コピー数増幅することが可能な組換え遺伝

子増幅方法が求められている。遺伝子増幅による組換え蛋白質の生産性が向上した細胞を迅速に選択可能である、組換え遺伝子増幅方法が求められている。

【0011】

【課題を解決するための手段】

酵母等の真核生物、エンドウマメ、アフリカツメガエル、ラット、マウス、ヒト、更には大腸菌等の原核生物において、rRNA遺伝子はスペーサー配列からなるユニットの繰り返し構造をとっている [Annu. Rev. Biochem., 49, 727 (1980)、Nuc. Acids Res., 22, 5038 (1994)、EMBO J., 7, 303 (1988)、Mol. Cell. Biol., 13, 6600 (1993)、J. Biol. Chem., 271, 2608 (1996)、Chromosoma, 104, 511 (1996)、DNA replication in Eukaryotic cell, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)、J. Bacteriol., 177, 783 (1995)]。

【0012】

従って、rRNA遺伝子の増幅には、rRNA遺伝子のコピー数を制御する一般的な機構が存在すると考えられた。

本発明者らは、上記のようにrRNA遺伝子が繰り返し構造をとって多コピー数存在することに着目し、該rRNA遺伝子が増幅される機構を解明し、該機構を利用することにより、目的とする遺伝子を増幅することが可能となるとの推測をもとに、鋭意検討した。

【0013】

即ち、以下の方法で遺伝子増幅に関わる機構を解明した。

本発明では、rRNA遺伝子の増幅機構を解明するために、酵母の遺伝子の複製にかかわると考えられている複製フォーク阻害 (replication fork blocking; 以下、RFBと称す)領域、およびFOB1遺伝子の関係について着目した。

【0014】

遺伝子複製時の複製フォークに対する阻害機構には、関連遺伝子を破壊した変異株と関連遺伝子以外の遺伝子型が一致している野生株とを用いて、遺伝子の増幅を比較することより解析した。

遺伝子増幅では遺伝子組換えが効率よく行われると考えられることから、染色体上のDNA組換えのホットスポットに着目した。rRNA遺伝子において、近傍遺伝

子の相同組換え頻度を促進させる活性を有する領域 (HOT1) にはRNAポリメラーゼIが必須である。そこで、RNAポリメラーゼIの欠損変異株でのrRNA遺伝子の増幅を野生株と比較した。

【0015】

更に、酵母において、FOB1遺伝子の変異により、RFB部位における複製フォーク阻害およびHOT1断片の遺伝子組換え促進活性の両方が消失することが知られているため、RNAポリメラーゼIの欠損変異株にFOB1遺伝子も欠損させた変異株を作製した。

【0016】

RNAポリメラーゼIの欠損変異株としては、RNAポリメラーゼIの2番目に大きいサブユニットであるA135をコードしているRPA135遺伝子を破壊したNOY408-1a株 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 3962 (1991)、遺伝子型; MAT α , ade2-1 ura3-1 his3-11 trp2-3,112 can1-100 rpa135::LEU2 pNOY102] を用いた。

【0017】

該欠損変異株に対する野生型株として二倍体NOY408株 [Mol. Cell. Biol., 11, 754 (1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 3962 (1991)、遺伝子型; MAT α /MAT α ade2-1/ade2-1 ura3-1/ura3-1 his3-11/his3-11 trp1-1/trp1-1 leu2-3,112/leu2-3,112 can1-100/can1-100 rpa135::LEU2/RPA135 pNOY102]、半数体NOY408-1b株 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 3962 (1991)、遺伝子型; MAT α ade2-1 ura3-1 his3-11 trp2-3,112 can1-100 pNOY102] を用いた。

【0018】

RNAポリメラーゼIおよびFOB1遺伝子の欠損変異株としては、前述のNOY408-1a株のFOB1遺伝子を破壊した株であるNOY408-1afを用いた。

各種欠損変異株とその野生型株との第12番染色体中のrRNA遺伝子のコピー数を、サザンブロット法 [J. Mol. Biol., 98, 503 (1975)]、競合的PCR法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2725 (1990)] を用い、比較・定量した。

【0019】

コピー数が1であることが既知の遺伝子 (対照用遺伝子) について、上記と同様の方法で定量され、得られた結果を内部標準として用い、より正確な定量を行

った。更に、競合的PCRにより正確なコピー数を算出した。

その結果、酵母において、組換えのホットスポット領域HOT1の相同組換え促進活性に必要なRNAポリメラーゼIの欠損株ではrRNA遺伝子のコピー数が半減する、RNAポリメラーゼIおよびFOB1遺伝子の欠損株ではrRNA遺伝子のコピー数がRNAポリメラーゼIの欠損株よりもさらに減少する、RNAポリメラーゼIおよびFOB1遺伝子の欠損株ではrRNA遺伝子のコピー数がRNAポリメラーゼI遺伝子のみの強制的な発現だけでは全く回復せず、RNAポリメラーゼIとFOB1遺伝子をともに発現させることにより初めて回復する現象を見出し、rRNA遺伝子の増幅には、組換えのホットスポット領域、自律複製配列およびFOB1遺伝子の発現蛋白質が必要であることを見出し、rRNA遺伝子のコピー数を制御する一般的な機構を解明することにより本発明を完成するに至った。

【0020】

即ち、本発明は、以下の(1)～(20)に関する。

(1) 組換えのホットスポット領域および自律複製配列を、組換え導入された外来遺伝子に近接して配置し、複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質を存在させることにより、外来遺伝子を増幅させる方法。

【0021】

(2) 外来遺伝子に近接して配置する位置が、外来遺伝子の上流および／または下流の位置である、上記(1)記載の方法。

(3) 組換えのホットスポット領域が、HOT1由来のホットスポット領域である、上記(1)記載の方法。

【0022】

(4) 組換えのホットスポット領域が、複製フォークの進行を阻害する領域(Replication Fork Blocking; RFB)からなる、上記(1)または(2)記載の方法。

(5) 組換えのホットスポット領域が、DNA複製終結部(DNA Replication terminus; Ter)からなる、上記(1)記載の方法。

【0023】

(6) 複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質が配列番号25また

は 26 記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ複製フォークの進行を阻害する活性を含む蛋白質である、上記 (1) 記載の方法。

【0024】

(7) 配列番号 25 または 26 記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質。

上記のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、出願前周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができ、また、1 若しくは数個のアミノ酸とは、部位特異的変異誘発法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数のアミノ酸を意味する。

【0025】

かかる 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー クローニング 第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント プロトコル イン モレキュラ バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、PCT W085/00817 (1985)、Nature, 316, 601 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

【0026】

(8) 上記 (7) 記載の蛋白質をコードする DNA。

(9) 上記 (8) 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質をコードする DNA

【0027】

(10) 配列番号27または28記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質をコードするDNA。

上記の「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質をコードするDNA」とは、上記(8)、(9)または(10)記載のDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

【0028】

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー クローニング 第2版、カレント プロトコル イン モレキュラ バイオロジー (、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。

【0029】

ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号27または28で表される塩基配列と少なくとも80%以上の相同性を有するDNA、好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

(11) 上記(8)~(10)記載のいずれか1項に記載のDNAをベクターに組み込んで得られる、該DNAのコードする蛋白質を発現することのできる組換えベクター。

【0030】

(12) 外来遺伝子発現用ベクターにおいて、組換えのホットスポット領域および自動複製配列を、組換え導入された該外来遺伝子に近接して配置して得られる外来遺伝子増幅用ベクター。

(13) 外来遺伝子に近接して配置する位置が、外来遺伝子の上流および／または下流の位置である、上記(12)記載の外来遺伝子増幅用ベクター。

【0031】

(14) 組換えのホットスポット領域が、H0T1由来のホットスポット領域である、上記(12)記載の外来遺伝子増幅用ベクター。

(15) 組換えのホットスポット領域が、複製フォークの進行を阻害する領域(Replication Fork Brocking;RFB)からなる、上記(12)または(13)記載の外来遺伝子増幅用ベクター。

【0032】

(16) 組換えのホットスポット領域が、DNA複製終結部(DNA Replication terminus;Ter)からなる、上記(12)記載の外来遺伝子増幅用ベクター。

(17) 上記(8)～(10)記載のいずれかより選ばれたDNAを組み込んでなる、上記(12)～(16)記載の外来遺伝子増幅用ベクター。

【0033】

(18) 上記(12)～(17)のいずれかに記載のベクターより選ばれるベクターを1つ以上宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

(19) 上記(18)記載の形質転換体を用いた外来遺伝子を増幅させる方法。

【0034】

(20) 上記(18)記載の形質転換体を用いた、外来遺伝子にコードされた蛋白質の製造法。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0035】

【発明の実施の形態】

組換え導入された外来遺伝子は、組換えのホットスポット領域および自律複製配列を、該外来遺伝子に近接して配置し、複製フォークの進行を阻害する活性を

有する蛋白質を存在させることにより増幅することができる。

【0036】

外来遺伝子としては、あらゆる遺伝子を用いることができる。

組換えのホットスポット領域とは、遺伝子の複製が行われる際に、その近接する相同的遺伝子組換えが著しく上昇するような領域のことであり、本発明においては、該相同的遺伝子組換えが著しく上昇させることのできる領域であればいずれも用いることができる。

【0037】

具体的には、酵母のHOT1 [Cell, 39, 377 (1984)]、大腸菌のHOT A、HOT B、HOT C、等をあげることができる。また、ホットスポット領域全域が必ずしも必要とされるわけではなく、ホットスポット領域内の重要な領域のみを用いることもでき、例えば、ホットスポット領域内の複製フォーク阻害 (Replication Fork Blocking; RFB) 領域をあげることができる。具体的には、酵母のHOT1内に存在するE-element領域 [Cell, 39, 663 (1984); Mol. Cell. Biol., 13, 1283 (1993)]、大腸菌のHOT A、HOT B、HOT C内に存在するTerA、TerB、TerC等をあげることができる。ホットスポット領域内の相同組換え頻度を促進させる活性に必要な領域を用いることもでき、例えば、酵母のHOT1内に存在するI-element領域 [Cell, 48, 1071 (1987)] をあげることができる。

【0038】

ここで、RFBとは、遺伝子の複製時に起こる転写開始点からの複製フォークの進行が、一方向だけ停止してしまう領域のことである。

自律複製配列 (Auto Replication Sequence; ARS) とは、複製開始点を含み、その複製開始点からの遺伝子の複製が可能な領域のことであり、該複製の可能な領域であればいずれも用いることができる。具体的には、酵母のrRNA遺伝子内に見出されているARS等をあげることができる。

【0039】

組換えのホットスポット領域および自律複製配列は、組換え導入された外来遺伝子に近接して配置されていれば、該外来遺伝子の上流あるいは下流いずれに配置されていてもよい。また、上流および下流に配置してもよい。

このように配置された組換えのホットスポット領域、自律複製配列、外来遺伝子を含む領域を染色体上、あるいはベクターに組み込み複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質の存在下で外来遺伝子を増幅する。

【0040】

複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質としては、該活性を有する蛋白質であればいずれも用いることができ、具体的には、酵母で見出されたFOB1遺伝子にコードされた蛋白質、大腸菌で見出されたtau (tus) 遺伝子 [EMBO J., 8, 2435 (1989); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1593 (1989)] にコードされた蛋白質等をあげることができる。

【0041】

ベクターを利用して外来遺伝子を増幅させる方法を以下、詳細に説明する。

組換えのホットスポット領域および自律複製領域を、増幅したい外来遺伝子に近接して上述のように配置したベクターを造成し、該ベクターを宿主細胞に導入後、複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質をコードするDNAを組み込んだベクターを宿主細胞に導入して発現させるか、あるいは、組換えのホットスポット領域、自律複製領域および複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質をコードするDNAを同一発現ベクター上に挿入し、宿主細胞に導入したベクターを発現させることにより、特別な薬剤等を用いなくとも、効率的に外来遺伝子のユニットのコピー数を上昇させることが可能である。このときベクターとして外来遺伝子の発現可能なベクターを用い、プロモーター、リボソーム結合配列、を上流に、必要に応じて転写終結配列を下流に有する外来遺伝子を用いることにより、外来遺伝子のユニットのコピー数を上昇させることができるだけでなく、該外来遺伝子のコードする蛋白質を効率よく生産させることができる。該方法を用いることにより、外来遺伝子のコードする蛋白質の生産量の高い形質転換体を効率よく選択することも可能である。プロモーター、リボソーム結合配列等は外来遺伝子が本来有するものを用いてもよいが、発現効率を上昇するようなものに組換えたものを用いてもよい。このようなプロモーター、リボソーム結合配列については後述する。

【0042】

以下、発現ベクターを用いた場合の外来遺伝子のユニットのコピー数を上昇させ、外来遺伝子のコードする蛋白質を生産するための外来遺伝子増幅用ベクターの造成法および外来遺伝子のコードする蛋白質の生産法について説明する。複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質を生産するための発現ベクターおよび該蛋白質の生産も同様の方法で効率よく生産させることができるためあわせて説明する。

【0043】

プロモーター、リボソーム結合配列を上流に、必要に応じて転写終結配列を下流に有する外来遺伝子に近接して、組換えのホットスポット領域および自律複製領域を上述のように配置した組換えベクターを造成し、該ベクターを宿主細胞に導入し、外来遺伝子を発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養することにより、外来遺伝子のユニットのコピー数を上昇させ、外来遺伝子のコードする蛋白質を製造することができる。

【0044】

複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質の場合は、プロモーター、リボソーム結合配列、該蛋白質をコードするDNA、転写終結配列より構成された組換えベクターを造成し、該ベクターを宿主細胞に導入し、該蛋白質を発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養することにより、該蛋白質を製造することができる。

【0045】

宿主細胞としては、細菌等の原核生物、あるいは酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等の真核生物など、目的とする遺伝子を発現できる細胞であればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、遺伝子導入確認のための薬剤耐性、栄養要求性等のマーカー遺伝子をもっていることが望ましい。

【0046】

大腸菌等原核生物を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとしては、例えば、pSE280（インビトロジェン社製）、pGEMEX-1（Promega社製）、pQE-8（QIAGEN社製）、pKYP10（特開昭58-110600

)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-) (STRATAGENE社)、pTrs30 (FERM BP-5407)、pTrs32 (FERM BP-5408)、pGHA2 (FERM BP-400)、pGKA2 (FERM B-6798)、pTerm2 (特開平3-22979、USP4686191、USP4939094、USP5160735)、pKK233-3 (アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製)、pGEX (Pharmacia社製)、pETシステム (Novagen社製)、pSupex、pTrxFus (Invitrogen社)、pMAL-c2 (New England Biolabs社) 等をあげることができる。

【0047】

プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば大腸菌を宿主とした場合は、trpプロモーター (Ptrp)、lacプロモーター (Plac)、P_Lプロモーター、T7プロモーター、P_Rプロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター等をあげることができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター (Ptrp x 2)、tacプロモーター、T7lacプロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。枯草菌を宿主とした場合は、枯草菌のファージであるSPO1やSPO2のプロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。

【0048】

リボソーム結合配列としては、シャインーダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli H

B101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli N Y49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniophilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

【0049】

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-248394)、エレクトロポレーション法 [Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)]等を挙げることができる。

【0050】

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等をあげることができる。これらのベクターは、RFB領域を含む塩基配列をクローニングサイトの下流に挿入することにより改変して用いることができる。

【0051】

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターを挙げることができる。

【0052】

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属、ビヒア属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccha

romyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Pichia pastoris等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in Enzymology, 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法 [Journal of Bacteriology, 153, 163 (1983)]等をあげることができる。

【0053】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p cDNA I/Amp (インビトロジェン社製)、p cDNA I、pAMoERC3Sc、p CDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、p AGE 107 [特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、p REP 4 (インビトロジェン社製)、p AGE 103 [Journal of Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、p AMo、p AMoA、p AS 3-3 (特開平2-227075)等があげられる。

【0054】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーターおよびエンハンサー、SV40の初期プロモーターラウス肉腫ウイルス (Rous sarcoma virus; RSV)、ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus; HIV)、モロニーマウス白血病ウイルス (Moloney mouse leukemia virus; MMLV) 等レトロウイルスのロング・ターミナル・リピート (long terminal repeat) などのウイルス由来の配列、あるいはメタロチオネインβ-アクチン、伸長因子 (Elongation factor) -1、熱ショック蛋白質などの動物細胞由来の遺伝子のプロモーター等をあげることができる。

【0055】

動物細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞またはNamalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299

）等をあげることができる。

【0056】

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NS0等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293(ATCC: CRL-1573)等、ヒト白血球細胞としては、BALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7等をあげることができる。

【0057】

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等をあげることができる。

【0058】

上記のようにして、外来遺伝子導入用ベクターおよび複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質を生産するため発現ベクターを宿主細胞に導入する。

外来遺伝子導入用ベクターに、上記の条件で複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質をコードするDNAも導入した場合には、該外来遺伝子導入用ベクターのみを宿主細胞に導入すればよい。

【0059】

上記で取得された形質転換体は以下の方法で培養することができる。

形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら生物を培養する培地は、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

【0060】

炭素源としては、それぞれの形質転換体が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類が用いられる。

【0061】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられる。

【0062】

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。培地のpHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

【0063】

また培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

【0064】

形質転換体が動物細胞である場合、該細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI 1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に

牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

【0065】

培養は、通常pH6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0066】

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地〔ファーミンジェン (Pharmingen) 社製〕、Sf-900 II SFM培地 (Life Technologies社製)、ExCe11400、ExCe11405〔いずれもJRHバイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製〕、Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

【0067】

pH6～7、培養温度25～30℃がよく、培養時間は、通常1～5日間である。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0068】

【実施例】

以下の実施例中の方法は、特に明記してない限り、Method. in Yeast Genetics, Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY, (1994)、またはモレキュラー・クローニング 第2版の記載に従った。プラスミドを導入、もしくは遺伝子破壊により栄養要求性となった菌株については、要求するアミノ酸あるいはアデニンを20mg/L培地に添加し、培養は30℃で行った。

【0069】

実施例1 RNAポリメラーゼI欠損変異株におけるrRNA遺伝子のコピー数の減少

35S rRNA遺伝子の転写をつかさどるRNAポリメラーゼIの欠損がrRNA遺伝子の増幅に与える影響を、RNAポリメラーゼI欠損変異株を用いて調べた。

RNAポリメラーゼI欠損変異株としては、酵母NOY408-1a株を使用した。

【0070】

NOY408-1a株は、RNAポリメラーゼIのサブユニットで2番目に大きいA135サブユニットをコードするRPA135遺伝子が破壊され、RNAポリメラーゼIIにより転写されるGAL7遺伝子のプロモーターの支配下で35S rRNA遺伝子を発現させることのできるプラスミドpNOY102が導入された変異株である。RPA135遺伝子が破壊されることによりRNAポリメラーゼIに依存した35S rRNA遺伝子の転写はおきず、生育できなくなるが、pNOY102が導入されることにより35S rRNA遺伝子が発現され生育することが可能となる。GAL7プロモーターはガラクトースにより誘導を受けるので、ガラクトース含有培地では、NOY408-1a株は生育できるが、ガラクトースのかわりにグルコースを含有する培地では生育が停止する。

【0071】

NOY408-1a株は、二倍体親株NOY408株より、子嚢胞子分離により得られた半数体である。二倍体親株NOY408株 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 3962 (1991)、遺伝子型; MATa/MAT α ade2-1/ade2-1 ura3-1/ura3-1 his3-11/his3-11 trp1-1/trp1-1 leu2-3,112/leu2-3,112 can1-100/can1-100 rpa135::LEU2/RPA135 pNOY102] は、野生型RPA135遺伝子、LEU2遺伝子挿入により破壊されたRPA135遺伝子 (rpa135::LEU2) およびpNOY102をもつ。野生型RPA135遺伝子をもつ対照菌株としては、NOY408株および子嚢胞子分離で同時に得られたNOY408-1b株 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 3962 (1991)、遺伝子型; MATa ade2-1 ura3-1 his3-11 trp2-3,112 can1-100 pNOY102] を用いて比較した。

【0072】

(1) サザンブロットによる解析

NOY408-1a株をガラクトースを含有するYEp-ガラクトース培地 [Method. in Yeast Genetics, Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, (1994)] で30℃で培養したのち、常法により染色体DNAを抽出した。該染色体DNAを制限酵素BglIIで切断後、アガロースゲル電気泳動を行った。該アガロースゲルをメンブレンにブロットすることにより、rRNA遺伝子のサザンブロット解析を行った。rRNA遺伝子特異的プローブとしては、NOY408-1a株より染色体DNAを抽出し

、制限酵素HindIIIおよびSphIにより切断したDNA断片（約1.2kb）を、 ^{32}P で標識したものを用いた。前述したメンブレンと該プローブとを反応させて、rRNA遺伝子由来の4.6kbのバンドを検出した。バンドの検出と定量にはバイオイメージングアナライザーBAS2000（富士写真フイルム社製）を用いた。さらにバンドを定量するために、半数体ゲノム当たり1コピーであるMCM2遺伝子〔複製開始に関与する遺伝子：Genes & Development, 5, 944(1991)〕についても同様にしてサザンブロット解析した。MCM2遺伝子のバンドの量を内部標準として用いることによりrRNA遺伝子のバンドの量を校正し、相対的なコピー数を比較した。図2に結果を示したが、MCM2遺伝子のバンドの量はほぼ同一の条件で、RPA135遺伝子欠損変異株であるNOY408-1a株のrRNA遺伝子のコピー数は、野生型RPA135遺伝子をもつ株NOY408およびNOY408-1bの約半分に減少していた。

【0073】

（2）競合的PCRによる解析

より正確にコピー数の絶対値を知るために競合的PCRを行った。rRNA遺伝子のコピー数は、rRNA遺伝子中の5S rRNA遺伝子領域とNTS2領域のそれぞれについて計測した。1コピー数の内部標準としては、ピリミジン合成系の酵素遺伝子URA1およびURA3の転写を促進する転写因子であるPPR1遺伝子〔Mol. Gen. Gen., 184, 394 (1981); J. Mol. Biol., 180, 239 (1984)〕とMCM2遺伝子を用いた。増幅させるこれら4つの標的DNAについて、競合用DNAを作製するためにそれぞれ4本（1、2、3、4）の特異的プライマーを設計して合成した（塩基配列を配列番号1～16に示した。1～4；5S rRNA遺伝子特異的プライマー5S-1～5S-4、5～8；NTS2特異的プライマーNTS-1～NTS-4、9～12；PPR1遺伝子特異的プライマーPPR-1～PPR-4、13～16；MCM2遺伝子特異的プライマーMCM-1～MCM-4）。プライマー1と4は外部プライマーであり、制限酵素サイトの配列（5S rRNA遺伝子；Sall、NTS2；SacI、PPR1遺伝子；KpnI、MCM2遺伝子；AvaI）を5'末端に付加してある。プライマー2と3は内部プライマーであり、 λ ファージ由来の20塩基の配列を5'末端に付加してある。競合用DNAは、文献〔Gene, 122, 313 (1992)〕に基づいて、以下のようにして作製した。まず、プライマー1と3、プライマー2と4をそれぞれ用いたPCRを行って、2種類の断片を増幅させた。この両増幅断片

を単離後混合し、外部プライマーのみを用いてPCRを行い、それぞれの増幅断片の片鎖だけをさらに増幅させた。次いで増幅した片鎖同士を、それぞれの3'末端にあるλファージ由来の配列を利用してアニーリングさせ、プライマー兼鋳型として用いてPCRを行なうことにより、λファージ由来の20残基が中央に挿入された塩基配列を増幅させた。さらに、この4種類の増幅断片をそれぞれの外部プライマーの配列由来の制限酵素サイトで切断し、ベクターpUC18のマルチクローニングサイトに4つ並べてクローン化したプラスミドpUC-Comp (図3a) を競合用DNAとして用いた。

【0074】

この競合用DNAに対して、プライマー1と4から制限酵素サイトの配列を除いたプライマーAおよびB (配列番号17~24に塩基配列を示す。配列番号17,18; 5S rRNA遺伝子特異的プライマー、配列番号19,20; NTS2特異的プライマー、配列番号21,22; PPR1遺伝子特異的プライマー、配列番号23,24; MCM2遺伝子特異的プライマー) でPCRを行なうと、ゲノムDNAに対して行なった場合に比べて、中央に挿入された20bpだけ長い断片が増幅される。pUC-Compは、260nmの吸光度の測定によって濃度を測定し、競合的PCRに用いた。競合的PCRは以下の条件で行なった。コピー数を測定する各酵母から全ゲノムDNAを抽出し、EcoRIで切断したものを鋳型とし、種々の濃度の競合用DNA pUC-CompおよびプライマーAとBを添加し、95℃、8分間の熱処理をしたアンプリタック・ゴールド・タック・ポリメラーゼ (AmpliTaq Gold Taq polymerase; Perkin-Elmer社製) を用い、30サイクル (1サイクルの反応は、変性; 94℃で30秒間、アニーリング; 60℃で30秒間、伸長反応; 72℃で30秒間 からなる) のPCRを行った。増幅したDNA断片は、10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画し、ゲルを0.5mg/mlのエチジウムブロマイドで染色し、デンストメーターで定量した。標的遺伝子の分子数は、競合用DNAと標的DNAの量比によって、決定した。(図3b)

rRNA遺伝子の分子数として5SとNTS2の分子数の平均を取り、これを、半数体ゲノムあたり1コピーの遺伝子の分子数としてのMCM2とPPR1の分子数の平均で割ることにより、半数体ゲノムあたりのrRNA遺伝子のコピー数を計算した。RPA135遺伝子変異株NOY408-1aのrRNA遺伝子のコピー数は、半数体細胞あたり約80コピー

であり、正常なRPA135遺伝子を持つNOY408株やNOY408-1b株のコピー数150の約半分であった（図3c）。

【0075】

実施例2 RPA135遺伝子の導入による、rRNA遺伝子のコピー数減少の回復

（1）サザンブロットによる解析

実施例1で見られたNOY408-1a株におけるrRNA遺伝子のコピー数減少がRPA135遺伝子の欠失変異によることを確認するため、NOY408-1a株でRPA135遺伝子を発現させた場合のrRNA遺伝子のコピー数を調べた。野生型のRPA135遺伝子発現用マルチコピープラスミドpNOY117を用いて、酢酸リチウム法でNOY408-1a株を形質転換した。遺伝子導入後の分裂回数とコピー数の関係を見るために、一株あたり4つのクローンを選び、それぞれシングルクローン化させた。再び1クローンあたり直径1mmほどのコロニーを4つ拾い、混合して、またシングルクローン化させることを繰り返した。一つのコロニーには、純化された一つの細胞から、18世代の分裂で、 10^5 に増えた細胞が存在すると推定される。最終的に、1クローンあたり4つのコロニーを選び、2mlの液体培地で培養した。波長600nmで濁度を測ることにより、世代数を計算した。形質転換後、最長116世代までいくつかの世代の細胞から、染色体DNAを抽出後、実施例1の（1）と同様にしてrRNA遺伝子についてサザンブロット解析を行い、コピー数の測定を行なった。

【0076】

図2のレーン2～4に示すように、プラスミドpNOY117を導入したNOY408-1a株では、44、80、116と世代を重ねるごとにrRNA遺伝子のバンドの量すなわちコピー数が徐々に増加していた。なお、その間、内部標準であるMCM2遺伝子のコピー数に変化は無かった。実施例1の（2）で、野生型RPA135遺伝子をもつNOY408-1b株のrRNA遺伝子のコピー数は156コピーと推定されたので、そのときの校正したrRNA遺伝子のバンドの量から、各クローンのrRNA遺伝子のコピー数を計算し、4つのクローンの平均をrRNA遺伝子のコピー数とした。その結果、プラスミドpNOY117を導入したNOY408-1a株（図4●）では、世代を重ねるごとにrRNA遺伝子のコピー数が徐々に増加し、80世代付近で野生型RPA135遺伝子をもつ対照株NOY408（図4□）およびNOY408-1b（図4△）のレベルに回復する事が見出された。この

とき、NOY408およびNOY408-1b株、pNOY117を導入しないNOY408-1a株（図4 ■）は100世代以上の培養でもコピー数の変化は認められなかった。

【0077】

（3）パルスフィールドゲル電気泳動による解析

酵母のrRNA遺伝子は、第12番染色体上に位置する事が知られている。そこで、rRNA遺伝子のコピー数をパルスフィールド電気泳動を用いて第12番染色体の大きさを測定することにより、解析した。酵母の染色体DNAの抽出およびパルスフィールド電気泳動はSmithらの方法 [In Genome Analysis, IRL Press, p41-112, (1988)] に基づいて行なわれた。（1）のサザンブロット解析時に用いたのと同じ酵母細胞について、電気泳動装置CHEF-DR11 [バイオラッド (BioRad) 社] を用い、パルス時間300～900秒間、泳動時間68時間、100CV、14℃、0.5×TBE緩衝液の条件でパルスフィールドゲル電気泳動を行った後、（1）と同様にrRNA遺伝子断片をプローブとしたサザンブロット解析を行って、第12番染色体を検出した。rRNA遺伝子以外の部分の第12番染色体の長さは、1.0Mbpであり、rRNA遺伝子の繰り返しユニット（1コピー）は、9.1kbであることが知られているので、第12番染色体の長さからrRNA遺伝子のコピー数を計算することができる。

【0078】

RPA135遺伝子欠損株であるNOY408-1aの第12番染色体の長さは、図5 aのレーン6および7に示すように、1.1Mbp～1.9Mbpであり、正常なRPA遺伝子を持つ親株NOY408の約2.4Mbpの第12番染色体と比較して短く（図5 aのレーン11）、コピー数としては11～90コピーと計算された。NOY408-1a株にRPA135遺伝子発現用プラスミドpNOY117を導入すると、世代の進行とともに、第12番染色体の長さが伸長していることが確認された（図5 aのレーン8～10）。第12番染色体の長さは44世代（レーン8）では2.0Mbpで109コピー、80世代（レーン9）では2.2Mbpで132コピー、116世代（レーン10）では2.4Mbpで154コピーのrRNA遺伝子を含む長さに相当した。

【0079】

実施例3：複製フォーク阻害欠損株におけるrRNA遺伝子の遺伝子増幅

複製フォーク阻害活性は、35S rRNAの転写には依存していないことが報告され

ているが [Mol. Gen. Genet., 233, 355 (1992); Cell, 71, 267 (1992)]、FOB1遺伝子がrRNA遺伝子の遺伝子増幅に関与するかどうかについて検討した。

【0080】

(1) RPA135遺伝子欠損株におけるFOB1遺伝子依存的な複製フォーク阻害活性

NOY408-1a株のrRNA遺伝子クラスター内のRFB部位における複製フォーク阻害活性を文献 [Cell, 51, 463 (1987)] の方法に基づいて調べた。すなわち、NOY408-1a株から常法により抽出した染色体DNAを、制限酵素BglIIIおよびSphIで切断し、該DNA断片をアガロースゲル2次元電気泳動した。該アガロースゲルをメンブレンにブロットすることにより、実施例1の(1)と同様にしてrRNA遺伝子のサザンブロット解析を行なった。その結果、RFB部位で複製フォークが停止した際に形成される特異的なY型DNA (Y-form DNA) のスポット [Cell, 71, 267 (1992)] が観察され、NOY408-1a株は複製フォーク阻害活性を有していることが確認された (図6a)。

【0081】

そこで、NOY408-1a株のFOB1遺伝子を破壊した株 (NOY408-1afと記す) を下記のようにして作製した。HIS3遺伝子をもつプラスミドpJJ214 [Yeast, 6, 363 (1990)] を鋳型にして、5'末端にそれぞれNruIまたはClaI部位の塩基配列を有するHIS3遺伝子特異的プライマーを用いてPCRを行なうことによりHIS3遺伝子を増幅した。該増幅産物の末端をNruIおよびClaIで切断したHIS3遺伝子断片を、プラスミドpUC-FOB1 [Genes to Cells, 1, 465 (1996)] のFOB1遺伝子内にあるNruI/ClaI間に挿入することにより、FOB1遺伝子が破壊されたプラスミドpUC-fob1::HIS3を作製した。このプラスミドpUC-fob1::HIS3をEcoRIで切断して直鎖状にした後、酢酸リチウム法によって、NOY408-1a株に導入した。his3-11変異を有しヒスチジン要求性であるNOY408-1a株から、相同的組換えによりFOB1遺伝子がfob1::HIS3に置き換わることにより、ヒスチジン非要求性に形質転換した細胞を選択し、FOB1遺伝子の破壊されたNOY408-1af株を得た。NOY408-1af株について、上記と同様にして複製フォーク阻害活性を調べたところ、Y型DNAのスポットは完全に消失し、フォーク阻害活性が欠損していることが確認された (図6b)。

【0082】

文献 [Genes to Cells, 1, 465 (1996)] の記載と同様にしてPCR法により増幅したFOB1遺伝子断片を、酵母発現用ベクターYEplac195 [Gene, 74, 527 (1988)] のBamHIサイトに挿入することにより、FOB1遺伝子発現用プラスミドYEp-FOB1を作製した。該プラスミドでNOY408-1af株を形質転換した株について、上記と同様にして複製フォーク阻害活性を調べたところ、Y型DNAのスポットが再度観察され、複製フォーク阻害活性が回復していることが確認された(図6c)。

【0083】

以上のことから、RNAポリメラーゼIの欠損変異株においても、rRNA遺伝子のRFB部位における複製フォーク阻害活性はFOB1遺伝子に依存していることが確認された。

(2) サザンブロットによる解析

次に、FOB1遺伝子とRPA135遺伝子の両者が変異しているNOY408-1af株におけるrRNA遺伝子のコピー数を、実施例2と同様にして世代の進行ごとにサザンハイブリダイゼーションにより解析し、コピー数を定量したところ、rRNA遺伝子のコピー数はRPA135遺伝子変異株NOY408-1aと比較してさらに約半数に減少していた(図2のレーン5、図4◇)。コピー数は100世代を超えても変化しなかった。NOY408-1af株にRPA135発現用プラスミドpNOY117を導入した場合でも、NOY408-1a株と異なり、100世代を超えてもrRNA遺伝子のコピー数の回復は見られなかった(図2のレーン6～8、図4▲)。しかし、このpNOY117で形質転換したNOY408-1af株にさらにFOB1発現用プラスミドYEp-FOB1を導入した場合は、rRNA遺伝子のコピー数の上昇が認められた(図2のレーン12～14)。コピー数を定量したところ、1世代に1コピーほどの割合で徐々に増加し、80世代ほどでその増加は止まり、それ以降は増えなかった(図4○)。FOB1遺伝子を含まないベクターYEplac195を導入した場合には、コピー数の上昇は認められなかった(図2のレーン9～11、図4▽)。以上の結果よりrRNA遺伝子の増幅には、RNAポリメラーゼIのみならず、FOB1遺伝子産物により、rRNA遺伝子の繰り返し構造中のRFB部位で複製フォークの伸長が阻害されることが必須であることが分かった。

【0084】

(3) パルスフィールドゲル電気泳動による解析

実施例 2 と同様にして、RPA135 遺伝子と FOB1 遺伝子の両者が欠損している NOY408-1af 株の第 12 番染色体の長さをパルスフィールドゲル電気泳動後のサザンブロット解析により検出したところ、RPA135 遺伝子欠損 NOY408-1a 株よりもさらに短い 1.34Mbp であり、約 40 コピーの rRNA 遺伝子が繰り返されていることがわかった（図 5 a のレーン 1、2）。

【0085】

NOY408-1af 株に RPA135 遺伝子発現プラスミド pNOY117 を導入し、116 世代まで培養しても第 12 番染色体の長さには変化がなかったが（図 5 a のレーン 3～5、図 5 b のレーン 1）、さらに FOB1 遺伝子発現プラスミド YEp-FOB1 を導入すると、44、80、116 世代と増殖が進行するに連れ、第 12 番染色体の長さの伸長がみられた（図 5 b のレーン 5～7）。NOY408-1a 株に pNOY117 を導入した場合に比べて伸長のばらつきが大きい、116 世代では親株 NOY408（図 5 b のレーン 8）とほぼ同程度の長さを示した。なお、ベクター YEp-lac195 を YEp-FOB1 の代わりに導入した場合には、116 世代まで増殖させても第 12 番染色体の長さに変化はなかった（図 5 b のレーン 2～4）。

【0086】

実施例 4 RNAポリメラーゼ I 欠損変異株の rRNA 遺伝子のコピー数の減少に対する FOB1 遺伝子の関与

NOY408 株から FOB1 遺伝子を破壊して作製された FOB1 遺伝子ホモ欠損二倍体株 NOY408-f [RPA135/rpa135, fob1/fob1] の子嚢体分離により、RPA135 遺伝子と FOB1 遺伝子の両者が欠損している姉妹半数体分体 [rpa135, fob1] 2 クローンを新たに分離し、NOY408-2af と名付けた。なお、この株の遺伝子型は NOY408-1af と同じである。また、NOY408 株 [RPA135/rpa135, FOB1/FOB1] から同様に子嚢体分離を行なって、新たに RPA135 遺伝子欠損半数体株のクローン [rpa135, FOB1] を分離し、NOY408-2a と名付けた。なお、この株の遺伝子型は NOY408-1a と同じである。それぞれの株について、最初の子嚢から増殖させ、計算した場合のいくつかの世代の細胞から染色体 DNA を抽出し、実施例 1 と同様にして第 12 番染色体の長さを検出したところ、野生型 FOB1 遺伝子をもつ NOY408-2a 株は、初期（44 世代）は野生株と同様のコピー数であるが、80 世代、116 世代と増殖が進行するにつれコピ

一数が減少していた（図5cのレーン4～6）。ところが、同時にFOB1遺伝子も欠損しているNOY408-2af株では染色体の長さは変化がなかった（図5cのレーン1～3）。つまり、FOB1遺伝子は、遺伝子増幅のみならず、rRNA遺伝子のコピー数の減少にも必要である。

【0087】

【発明の効果】

組換えのホットスポット領域および自律複製配列を、組換え導入された外来遺伝子に近接して配置し、複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質を存在させることにより、外来遺伝子を増幅させる方法が示された。この方法を組換え遺伝子増幅系に応用し、遺伝子増幅に薬剤を不要とする、新規の組換え遺伝子増幅系として活用することにより、組換えタンパクの高生産細胞の選択を効率化することができることを示した。

【0088】

「配列表フリーテキスト」

配列番号1－人工配列の説明：合成DNA

配列番号2－人工配列の説明：合成DNA

配列番号3－人工配列の説明：合成DNA

配列番号4－人工配列の説明：合成DNA

配列番号5－人工配列の説明：合成DNA

配列番号6－人工配列の説明：合成DNA

配列番号7－人工配列の説明：合成DNA

配列番号8－人工配列の説明：合成DNA

配列番号9－人工配列の説明：合成DNA

配列番号10－人工配列の説明：合成DNA

配列番号11－人工配列の説明：合成DNA

配列番号12－人工配列の説明：合成DNA

配列番号13－人工配列の説明：合成DNA

配列番号14－人工配列の説明：合成DNA

配列番号15－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 16-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 17-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 18-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 19-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 20-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 21-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 22-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 23-人工配列の説明：合成DNA

配列番号 24-人工配列の説明：合成DNA

【0089】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Method to amplify recombinant gene using a factor for ribosomal RN
A gene amplification

<130> H10-1381Q3

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.0

【 0 0 9 0 】

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA
end.

<400>1

gcgtcgacgt tgcggccata tctaccag

【 0 0 9 1 】

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400>2

ccagcctcgc atatgaccaa taccagctta actacagttg

【 0 0 9 2 】

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400>3

ttcctgatat gcgaggctgg agagcctgac cgagtagtgt

【 0 0 9 3 】

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400>4

gcgtcgacag attgcagcac ctgagttt

【0094】

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400>5

gcgtcgacgt tgcggccata tctaccag

【0095】

<210> 6

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400>6

ccagcctcgc atatgaccaa taccagctta actacagttg

【 0 0 9 6 】

<210> 7

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400>7

ccatcagata tcgttccgtc aatccatgcc ataacaggaa

【 0 0 9 7 】

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400>8

gggagctctg aatagacata ggagtaag

【 0 0 9 8 】

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA

<400> 9

ggggtaccat aaggagatca gtgcgctg

【 0 0 9 9 】

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA

<400>10

ccagcctcgc atatgaccaa taccagctta actacagttg

【 0 1 0 0 】

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400>11

tggtacgtc ctgatgcagg gcaactaatt ttcgtcaaga

【 0 1 0 1 】

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400>12

gggtacctg gattgttttc agcctctg

【 0 1 0 2 】

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 13

ccccgggcgt agacgtgagg aagatga

【 0 1 0 3 】

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400>14

tgatttgtca aacgcctgcc accaataggt gatgaaactg

【 0 1 0 4 】

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400>15

ggcaggcgtt tgacaaatca tctggagata tgattaaccc

【 0 1 0 5 】

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400>16

ccccgggcgt ccatcaaate tacttcg

【 0 1 0 6 】

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400>17

gttgcgcca tatctaccag

【 0 1 0 7 】

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400>18

agattgcagc acctgagttt

【 0 1 0 8 】

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400>19

gttgcgcca tatctaccag

【 0 1 0 9 】

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA

<400>20

tgaatagaca taggagtaag

【 0 1 1 0 】

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequense : Synthetic DNA

<400> 21

ataaggagat cagtgcgctg

【 0 1 1 1 】

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400>22

tggattgttt tcagcctctg

【 0 1 1 2 】

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 23

cgtagacgtg aggaagatga

【 0 1 1 3 】

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400>24

cgtccatcaa atctacttcg

【 0 1 1 4 】

<210> 25

<211> 566

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 25

Met Thr Lys Pro Arg Tyr Asn Asp Val Leu Phe Asp Asp Asp Asp Ser

1

5

10

15

Val Pro Ser Glu Ser Val Thr Arg Lys Ser Gln Arg Arg Lys Ala Thr

20

25

30

Ser Pro Gly Glu Ser Arg Glu Ser Ser Lys Asp Arg Leu Leu Ile Leu

35

40

45

Pro Ser Met Gly Glu Ser Tyr Thr Glu Tyr Val Asp Ser Tyr Leu Asn

50

55

60

Leu Glu Leu Leu Glu Arg Gly Glu Arg Glu Thr Pro Ile Phe Leu Glu
65 70 75 80

Ser Leu Thr Arg Gln Leu Thr Gln Lys Ile Tyr Glu Leu Ile Lys Thr
85 90 95

Lys Ser Leu Thr Ala Asp Ala Leu Gln Gln Ile Ser Asp Lys Tyr Asp
100 105 110

Gly Val Val Ala Glu Asn Lys Leu Leu Phe Leu Gln Arg Gln Tyr Tyr
115 120 125

Val Asp Asp Glu Gly Asn Val Arg Asp Gly Arg Asn Asn Asp Lys Ile
130 135 140

Tyr Cys Glu Pro Lys His Val Tyr Asp Met Val Met Ala Thr His Leu
145 150 155 160

Met Asn Lys His Leu Arg Gly Lys Thr Leu His Ser Phe Leu Phe Ser
165 170 175

His Phe Ala Asn Ile Ser His Ala Ile Ile Asp Trp Val Gln Gln Phe
180 185 190

Cys Ser Lys Cys Asn Lys Lys Gly Lys Ile Lys Pro Leu Lys Glu Tyr
195 200 205

Lys Arg Pro Asp Met Tyr Asp Lys Leu Leu Pro Met Glu Arg Ile His
210 215 220

Ile Glu Val Phe Glu Pro Phe Asn Gly Glu Ala Ile Glu Gly Lys Tyr
225 230 235 240

Ser Tyr Val Leu Leu Cys Arg Asp Tyr Arg Ser Ser Phe Met Trp Leu
245 250 255

Leu Pro Leu Lys Ser Thr Lys Phe Lys His Leu Ile Pro Val Val Ser
260 265 270

Ser Leu Phe Leu Thr Phe Ala Arg Val Pro Ile Phe Val Thr Ser Ser
275 280 285

Thr Leu Asp Lys Asp Asp Leu Tyr Asp Ile Cys Glu Glu Ile Ala Ser
290 295 300

Lys Tyr Gly Leu Arg Ile Gly Leu Gly Leu Lys Ser Ser Ala Arg Phe
305 310 315 320

His Thr Gly Gly Ile Leu Cys Ile Gln Tyr Ala Leu Asn Ser Tyr Lys
325 330 335

Lys Glu Cys Leu Ala Asp Trp Gly Lys Cys Leu Arg Tyr Gly Pro Tyr
340 345 350

Arg Phe Asn Arg Arg Arg Asn Lys Arg Thr Lys Arg Lys Pro Val Gln
355 360 365

Val Leu Leu Ser Glu Val Pro Gly His Asn Ala Lys Phe Glu Thr Lys

370	375	380
Arg Glu Arg Val Ile Glu Asn Thr Tyr Ser Arg Asn Met Phe Lys Met		
385	390	395
400		
Ala Gly Gly Lys Gly Leu Ile Tyr Leu Glu Asp Val Asn Thr Phe Ala		
405	410	415
Leu Ala Asn Glu Ala Asp Asn Ser Cys Asn Asn Asn Gly Ile Leu His		
420	425	430
Asn Asn Asn Ile Gly Asn Asp Asn Phe Glu Glu Glu Val Gln Lys Gln		
435	440	445
Phe Asp Leu Thr Glu Lys Asn Tyr Ile Asp Glu Tyr Asp Asp Leu Ala		
450	455	460
His Asp Ser Ser Glu Gly Glu Phe Glu Pro Asn Thr Leu Thr Pro Glu		
465	470	475
480		
Glu Lys Pro Pro His Asn Val Asp Glu Asp Arg Ile Glu Ser Thr Gly		
485	490	495
Val Ala Ala Pro Met Gln Gly Thr Glu Glu Pro Glu Lys Gly Asp Gln		
500	505	510
<hr/>		
Lys Glu Ser Asp Gly Ala Ser Gln Val Asp Gln Ser Val Glu Ile Thr		
515	520	525

Arg Pro Glu Thr Ser Tyr Tyr Gln Thr Leu Glu Ser Pro Ser Thr Lys
530 535 540

Arg Gln Lys Leu Asp Gln Gln Gly Asn Gly Asp Gln Thr Arg Asp Phe
545 550 555 560

Gly Thr Ser Met Glu Leu
565

【 0 1 1 5 】

<210> 26

<211> 309

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 26

Met Ala Arg Tyr Asp Leu Val Asp Arg Leu Asn Thr Thr Phe Arg Gln
1 5 10 15

Met Glu Gln Glu Leu Ala Ile Phe Ala Ala His Leu Glu Gln His Lys
20 25 30

Leu Leu Val Ala Arg Val Phe Ser Leu Pro Glu Val Lys Lys Glu Asp
35 40 45

Glu His Asn Pro Leu Asn Arg Ile Glu Val Lys Gln His Leu Gly Asn
50 55 60

Asp Ala Gln Ser Leu Ala Leu Arg His Phe Arg His Leu Phe Ile Gln
65 70 75 80

Gln Gln Ser Glu Asn Arg Ser Ser Lys Ala Ala Val Arg Leu Pro Gly

85

90

95

Val Leu Cys Tyr Gln Val Asp Asn Leu Ser Gln Ala Ala Leu Val Ser

100

105

110

His Ile Gln His Ile Asn Lys Leu Lys Thr Thr Phe Glu His Ile Val

115

120

125

Thr Val Glu Ser Glu Leu Pro Thr Ala Ala Arg Phe Glu Trp Val His

130

135

140

Arg His Leu Pro Gly Leu Ile Thr Leu Asn Ala Tyr Arg Thr Leu Thr

145

150

155

160

Val Leu His Asp Pro Ala Thr Leu Arg Phe Gly Trp Ala Asn Lys His

165

170

175

Ile Ile Lys Asn Leu His Arg Asp Glu Val Leu Ala Gln Leu Glu Lys

180

185

190

Ser Leu Lys Ser Pro Arg Ser Val Ala Pro Trp Thr Arg Glu Glu Trp

195

200

205

Gln Arg Lys Leu Glu Arg Glu Tyr Gln Asp Ile Ala Ala Leu Pro Gln

210

215

220

Asn Ala Lys Leu Lys Ile Lys Arg Pro Val Lys Val Gln Pro Ile Ala

225 230 235 240

Arg Val Trp Tyr Lys Gly Asp Gln Lys Gln Val Gln His Ala Cys Pro

245 250 255

Thr Pro Leu Ile Ala Leu Ile Asn Arg Asp Asn Gly Ala Gly Val Pro

260 265 270

Asp Val Gly Glu Leu Leu Asn Tyr Asp Ala Asp Asn Val Gln His Arg

275 280 285

Tyr Lys Pro Gln Ala Gln Pro Leu Arg Leu Ile Ile Pro Arg Leu His

290 295 300

Leu Tyr Val Ala Asp

305

【 0 1 1 6 】

<210> 27

<211> 1698

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1698)

<400> 27

atg acg aaa ccg cgt tac aat gac gtg ttg ttt gat gat gat gac tcg 48

Met Thr Lys Pro Arg Tyr Asn Asp Val Leu Phe Asp Asp Asp Asp Ser
1 5 10 15

gta cca tca gaa tca gtt acg agg aaa tcg cag aga aga aag gca acg 96
Val Pro Ser Glu Ser Val Thr Arg Lys Ser Gln Arg Arg Lys Ala Thr
20 25 30

tca cct ggg gaa tca aga gag tcc tca aaa gat cgt cta ctg ata ctt 144
Ser Pro Gly Glu Ser Arg Glu Ser Ser Lys Asp Arg Leu Leu Ile Leu
35 40 45

ccc tct atg ggg gaa tca tat act gag tac gta gac tct tat ttg aac 192
Pro Ser Met Gly Glu Ser Tyr Thr Glu Tyr Val Asp Ser Tyr Leu Asn
50 55 60

tta gaa tta ttg gaa agg gga gaa aga gaa aca cca atc ttt ctt gaa 240
Leu Glu Leu Leu Glu Arg Gly Glu Arg Glu Thr Pro Ile Phe Leu Glu
65 70 75 80

tct ctg aca aga caa cta acg cag aaa ata tat gaa cta ata aaa aca 288
Ser Leu Thr Arg Gln Leu Thr Gln Lys Ile Tyr Glu Leu Ile Lys Thr
85 90 95

aaa tct tta act gca gat gcc ttg caa caa ata agt gat aaa tac gat 336
Lys Ser Leu Thr Ala Asp Ala Leu Gln Gln Ile Ser Asp Lys Tyr Asp
100 105 110

ggt gta gtg gca gaa aac aag ctg tta ttt ttg caa aga cag tat tat 384
Gly Val Val Ala Glu Asn Lys Leu Leu Phe Leu Gln Arg Gln Tyr Tyr

115	120	125	
gtt gat gat gaa gga aat gtt aga gat ggc cga aat aat gat aaa ata 432			
Val Asp Asp Glu Gly Asn Val Arg Asp Gly Arg Asn Asn Asp Lys Ile			
130	135	140	
tac tgt gag cca aag cat gta tac gac atg gtg atg gca aca cac ttg 480			
Tyr Cys Glu Pro Lys His Val Tyr Asp Met Val Met Ala Thr His Leu			
145	150	155	160
atg aat aag cat ctt agg ggt aaa aca tta cat tcc ttt tta ttt tct 528			
Met Asn Lys His Leu Arg Gly Lys Thr Leu His Ser Phe Leu Phe Ser			
	165	170	175
cat ttt gcc aat att agt cat gcc atc atc gat tgg gtc cag caa ttt 576			
His Phe Ala Asn Ile Ser His Ala Ile Ile Asp Trp Val Gln Gln Phe			
	180	185	190
tgt tca aaa tgt aat aaa aag ggc aaa att aaa cca ttg aag gaa tat 624			
Cys Ser Lys Cys Asn Lys Lys Gly Lys Ile Lys Pro Leu Lys Glu Tyr			
195	200	205	
aaa cgt cct gac atg tac gat aaa cta cta cca atg gaa agg ata cat 672			
Lys Arg Pro Asp Met Tyr Asp Lys Leu Leu Pro Met Glu Arg Ile His			
210	215	220	
att gag gta ttc gaa ccc ttc aat gga gaa gct att gag gga aaa tat 720			
Ile Glu Val Phe Glu Pro Phe Asn Gly Glu Ala Ile Glu Gly Lys Tyr			
225	230	235	240

tct tat gtc ctt tta tgc cga gac tat cgc tct agt ttt atg tgg tta 768

Ser Tyr Val Leu Leu Cys Arg Asp Tyr Arg Ser Ser Phe Met Trp Leu

245

250

255

tta cca ctt aag agt acc aaa ttc aaa cat ctt atc cca gtt gtt tcc 816

Leu Pro Leu Lys Ser Thr Lys Phe Lys His Leu Ile Pro Val Val Ser

260

265

270

tca ctt ttt tta aca ttt gct agg gtt cca att ttc gta aca tca agc 864

Ser Leu Phe Leu Thr Phe Ala Arg Val Pro Ile Phe Val Thr Ser Ser

275

280

285

act tta gat aaa gat gat ctt tat gat att tgt gaa gaa att gca tca 912

Thr Leu Asp Lys Asp Asp Leu Tyr Asp Ile Cys Glu Glu Ile Ala Ser

290

295

300

aaa tac ggt ctc cgt att ggc ttg ggt ttg aag agt tct gcg aga ttt 960

Lys Tyr Gly Leu Arg Ile Gly Leu Gly Leu Lys Ser Ser Ala Arg Phe

305

310

315

320

cat act ggg ggt ata ctg tgc att cag tat gct cta aat agt tat aag 1008

His Thr Gly Gly Ile Leu Cys Ile Gln Tyr Ala Leu Asn Ser Tyr Lys

325

330

335

aag gaa tgt cta gcc gat tgg ggt aag tgc cta aga tat ggc cct tac 1056

Lys Glu Cys Leu Ala Asp Trp Gly Lys Cys Leu Arg Tyr Gly Pro Tyr

340

345

350

aga ttc aac cga agg aga aat aag aga acg aaa cgt aaa cct gtg caa 1104

Arg Phe Asn Arg Arg Arg Asn Lys Arg Thr Lys Arg Lys Pro Val Gln

355

360

365

gta cta ctt agt gaa gtt cca ggt cac aat gcc aag ttt gag act aag 1152

Val Leu Leu Ser Glu Val Pro Gly His Asn Ala Lys Phe Glu Thr Lys

370

375

380

aga gaa agg gtt ata gaa aac aca tat tcc cgt aat atg ttc aag atg 1200

Arg Glu Arg Val Ile Glu Asn Thr Tyr Ser Arg Asn Met Phe Lys Met

385

390

395

400

gca ggt gga aaa ggt ctt ata tat ttg gaa gat gtc aat act ttt gcc 1248

Ala Gly Gly Lys Gly Leu Ile Tyr Leu Glu Asp Val Asn Thr Phe Ala

405

410

415

ctt gct aat gaa gcg gat aat agc tgt aac aat aat gga att ctt cat 1296

Leu Ala Asn Glu Ala Asp Asn Ser Cys Asn Asn Asn Gly Ile Leu His

420

425

430

aat aac aat ata gga aat gat aac ttt gaa gaa gaa gtg caa aaa caa 1344

Asn Asn Asn Ile Gly Asn Asp Asn Phe Glu Glu Glu Val Gln Lys Gln

435

440

445

ttt gat cta act gaa aaa aac tat atc gat gag tat gat gat ttg gca 1392

Phe Asp Leu Thr Glu Lys Asn Tyr Ile Asp Glu Tyr Asp Asp Leu Ala

450

455

460

cat gat tct tca gag ggc gaa ttt gaa cct aat acc tta act ccc gaa 1440

His Asp Ser Ser Glu Gly Glu Phe Glu Pro Asn Thr Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

gaa aag cct cct cat aat gtc gat gag gac cga ata gag tcc acc ggc 1488
Glu Lys Pro Pro His Asn Val Asp Glu Asp Arg Ile Glu Ser Thr Gly
485 490 495

gtg gca gcc cca atg cag gga aca gaa gag cct gaa aaa ggg gat caa 1536
Val Ala Ala Pro Met Gln Gly Thr Glu Glu Pro Glu Lys Gly Asp Gln
500 505 510

aaa gaa agt gac ggt gca tca caa gta gat caa agt gtc gaa ata act 1584
Lys Glu Ser Asp Gly Ala Ser Gln Val Asp Gln Ser Val Glu Ile Thr
515 520 525

aga cca gaa act tcc tac tat caa act ctg gaa tcg ccg tca aca aaa 1632
Arg Pro Glu Thr Ser Tyr Tyr Gln Thr Leu Glu Ser Pro Ser Thr Lys
530 535 540

cga cag aaa tta gac caa cag ggt aat gga gat caa aca aga gac ttt 1680
Arg Gln Lys Leu Asp Gln Gln Gly Asn Gly Asp Gln Thr Arg Asp Phe
545 550 555 560

ggc aca tca atg gaa ttg 1698
Gly Thr Ser Met Glu Leu
565

[0 1 1 7]

<210> 28

<211> 927

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(927)

<400> 28

atg gcg cgt tac gat ctc gta gac cga ctc aac act acc ttt cgc cag 48

Met Ala Arg Tyr Asp Leu Val Asp Arg Leu Asn Thr Thr Phe Arg Gln

1 5 10 15

atg gaa caa gag ctg gct ata ttt gcc gct cat ctt gag caa cac aag 96

Met Glu Gln Glu Leu Ala Ile Phe Ala Ala His Leu Glu Gln His Lys

20 25 30

cta ttg gtt gcc cgc gtg ttc tct ttg ccg gag gta aaa aaa gag gat 144

Leu Leu Val Ala Arg Val Phe Ser Leu Pro Glu Val Lys Lys Glu Asp

35 40 45

gag cat aat ccg ctt aat cgt att gag gta aaa caa cat ctc ggc aac 192

Glu His Asn Pro Leu Asn Arg Ile Glu Val Lys Gln His Leu Gly Asn

50 55 60

gac gcg cag tcg ctg gcg ttg cgt cat ttc cgc cat tta ttt att caa 240

Asp Ala Gln Ser Leu Ala Leu Arg His Phe Arg His Leu Phe Ile Gln

65 70 75 80

caa cag tcc gaa aat cgc agc agc aag gcc gct gtc cgt ctg cct ggc 288

Gln Gln Ser Glu Asn Arg Ser Ser Lys Ala Ala Val Arg Leu Pro Gly

85

90

95

gtg ttg tgt tac cag gtc gat aac ctt tcg caa gca gcg ttg gtc agt 336

Val Leu Cys Tyr Gln Val Asp Asn Leu Ser Gln Ala Ala Leu Val Ser

100

105

110

cat att cag cac atc aat aaa ctc aag acc acg ttc gag cat atc gtc 384

His Ile Gln His Ile Asn Lys Leu Lys Thr Thr Phe Glu His Ile Val

115

120

125

acg gtt gaa tca gaa ctc ccc acc gcg gca cgt ttt gaa tgg gtg cat 432

Thr Val Glu Ser Glu Leu Pro Thr Ala Ala Arg Phe Glu Trp Val His

130

135

140

cgt cat ttg ccg ggg ctg atc acc ctt aat gct tac cgc acg ctc acc 480

Arg His Leu Pro Gly Leu Ile Thr Leu Asn Ala Tyr Arg Thr Leu Thr

145

150

155

160

gtt ctg cac gac ccc gcc act tta cgc ttt ggt tgg gct aat aaa cat 528

Val Leu His Asp Pro Ala Thr Leu Arg Phe Gly Trp Ala Asn Lys His

165

170

175

atc att aag aat tta cat cgt gat gaa gtc ctg gca cag ctg gaa aaa 576

Ile Ile Lys Asn Leu His Arg Asp Glu Val Leu Ala Gln Leu Glu Lys

180

185

190

agc ctg aaa tca cca cgc agt gtc gca ccg tgg acg cgc gag gag tgg 624

Ser Leu Lys Ser Pro Arg Ser Val Ala Pro Trp Thr Arg Glu Glu Trp

195	200	205	
caa aga aaa ctg gag cga gag tat cag gat atc gct gcc ctg cca cag 672			
Gln Arg Lys Leu Glu Arg Glu Tyr Gln Asp Ile Ala Ala Leu Pro Gln			
210	215	220	
aac gcg aag tta aaa atc aaa cgt ccg gtg aag gtg cag ccg att gcc 720			
Asn Ala Lys Leu Lys Ile Lys Arg Pro Val Lys Val Gln Pro Ile Ala			
225	230	235	240
cgc gtc tgg tac aaa gga gat caa aaa caa gtc caa cac gcc tgc cct 768			
Arg Val Trp Tyr Lys Gly Asp Gln Lys Gln Val Gln His Ala Cys Pro			
	245	250	255
aca cca ctg att gca ctg att aat cgg gat aat ggc gcg ggc gtg ccg 816			
Thr Pro Leu Ile Ala Leu Ile Asn Arg Asp Asn Gly Ala Gly Val Pro			
260	265	270	
gac gtt ggt gag ttg tta aat tac gat gcc gac aat gtg cag cac cgt 864			
Asp Val Gly Glu Leu Leu Asn Tyr Asp Ala Asp Asn Val Gln His Arg			
275	280	285	
tat aaa cct cag gcg cag ccg ctt cgt ttg atc att cca cgg ctg cac 912			
Tyr Lys Pro Gln Ala Gln Pro Leu Arg Leu Ile Ile Pro Arg Leu His			
290	295	300	

ctg tat gtt gca gat	927
Leu Tyr Val Ala Asp	
305	

【図面の簡単な説明】

【図1】は、酵母 (*S. cerevisiae*) におけるrRNA遺伝子の繰り返しユニットの構造を示す図である。

太い線は35S、5Sの各rRNA遺伝子の位置と方向を示し、その中の白い部分は35S rRNAのプロセッシング時に切断される転写スパーサー領域を表わす。

NTS1、NTS2：二つの非転写スパーサー領域

ARS：自律複製配列

I-element：HOT1のI-element

E-element：HOT1のE-element

Enhancer：35S rRNA転写のエンハンサー

RFB：RFB部位

白い四角：実施例1（2）で競合的PCRを行なった際に、増幅させた部位をそれぞれ表わす。

【図2】は、染色体DNAのrRNA遺伝子についてのサザンブロット解析を示す図である。レーン1はNOY408-1a株、レーン2～4はNOY408-1a株／pNOY117（それぞれ44、80、116世代）、レーン5はNOY408-1af株、レーン6～8はNOY408-1af株／pNOY117（それぞれ44、80、116世代）、レーン9～11はNOY408-1af株／pNOY117，YEplac195（それぞれ44、80、116世代）、レーン12～14はNOY408-1af株／pNOY117，YEp-FOB1（それぞれ44、80、116世代）、レーン15はNOY408株、レーン16はNOY408-1b株の結果である。

矢印のrDNAはrRNA遺伝子、MCM2はMCM2遺伝子のバンドの位置を示す。

【図3】は、染色体DNAを鋳型にしたrRNA遺伝子の競合的PCRの結果を示す図である。

aは、競合的PCRに用いた競合用DNA pUC-Compの構造を示す図である。

bは、競合的PCRのアクリルアミドゲル電気泳動の写真。左に増幅する標的遺伝子名、上に用いた酵母の株名を示す。各レーンの上のバンドはゲノムDNAに対する増幅産物、下のバンドは競合用DNAに対する増幅産物を示す。レーンの上の数字は加えた競合用DNAの量比、各写真の右の数字は計算された標的DNAの量比であ

り、MCM2とPPR1は 10^{-4} 倍、5SとNTSは 10^{-6} 倍した数値で表記してある。

cは、競合的PCRの結果求めた、各菌株におけるrRNA遺伝子のコピー数を示すグラフである。

【図4】は、半数体ゲノムあたりのrRNA遺伝子のコピー数を経時的に示した図である。横軸は世代数を示す。

【図5】は、染色体DNAのパルスフィールドゲル電気泳動のサザンプロット解析を示す図である。a、bはプラスミドを導入してからの各世代での結果、cは子囊発芽からの各世代での結果を示す。

a：レーン1,2はNOY408-af株（それぞれ44、116世代）、レーン3～5はNOY408-af/pNOY117（それぞれ44、80、116世代）、レーン6,7はNOY408-a株（それぞれ44、116世代）、レーン8～10はNOY408-a株/pNOY117（それぞれ44、80、116世代）、レーン11はNOY408株の結果である。

b：レーン1：NOY408-af株/pNOY117株、レーン2～4はNOY408-af/pNOY117, YEplac195（それぞれ44、80、116世代）、レーン5～7はNOY408-af株/pNOY117, YEp-FOB1（それぞれ44、80、116世代）、レーン8はNOY408株の結果である。

c：レーン1-3はNOY408-2af株（それぞれ44、80、116世代）、レーン4-6はNOY408-2a株（それぞれ44、80、116世代）を示す。

【図6】は、染色体DNAの2次元電気泳動後のサザンハイブリダイゼーションにより、フォーク阻害活性を検出した図である。矢印はY型DNAを指す。

aはNOY408-1a株、bはNOY408-af株、CはNOY408-af株/YEp-FOB1の結果である。

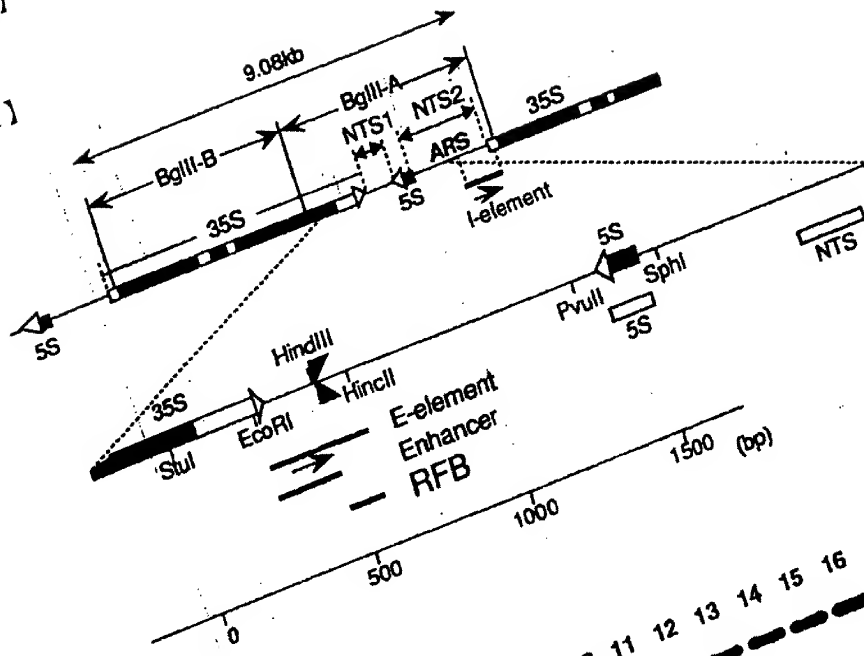
。

特平 10-292697

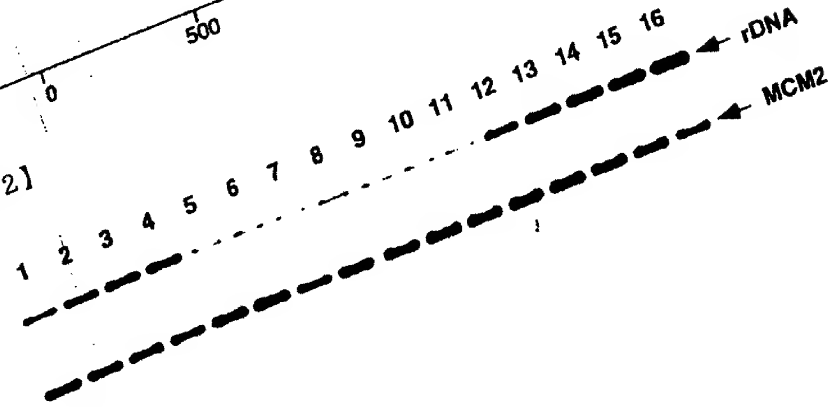
図面

【書類名】

【図1】

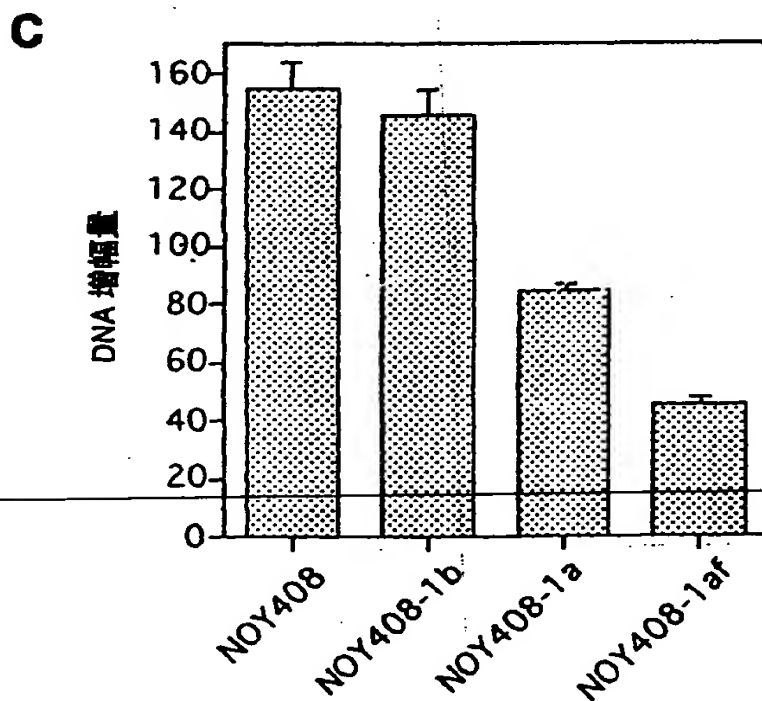
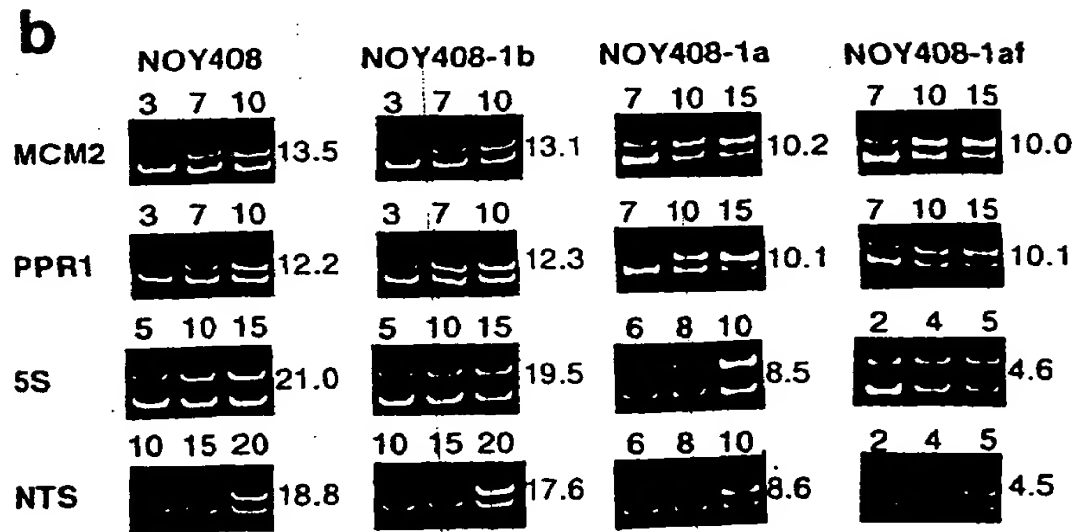
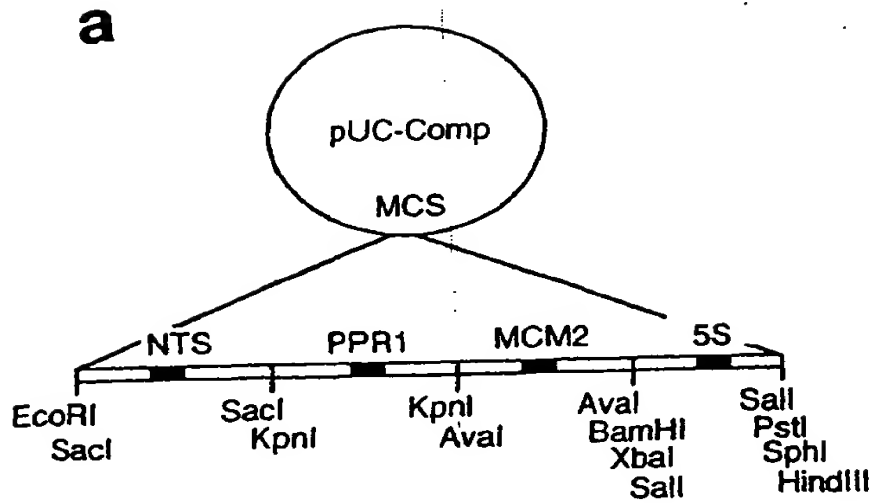


【図2】

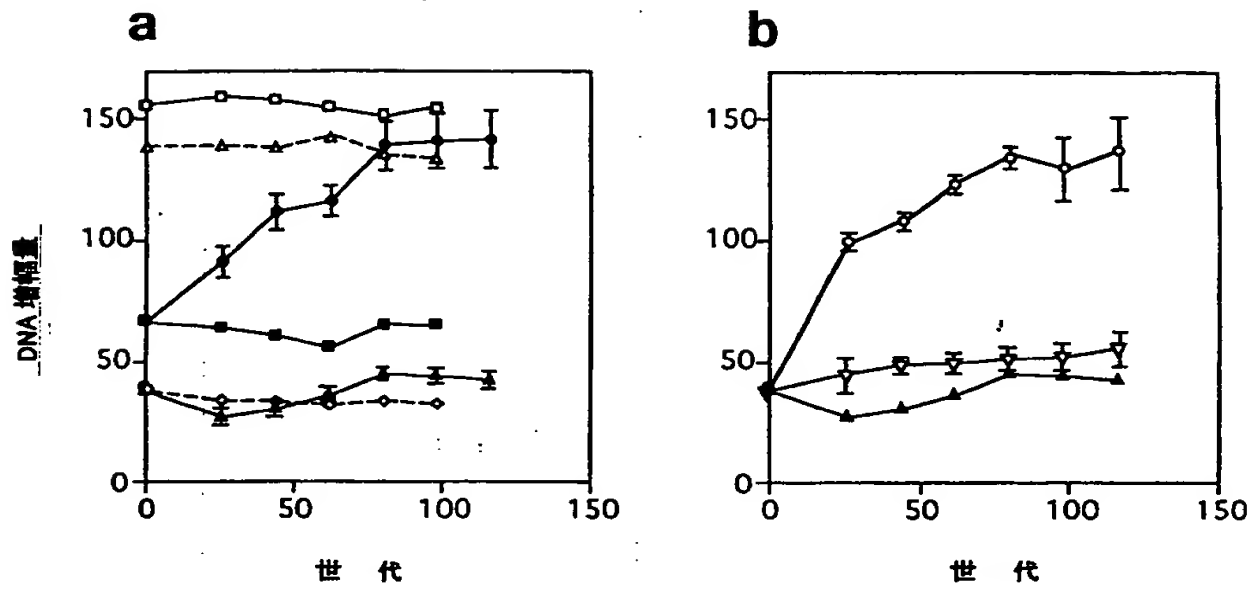


【図3】

出証特平 11-3079358

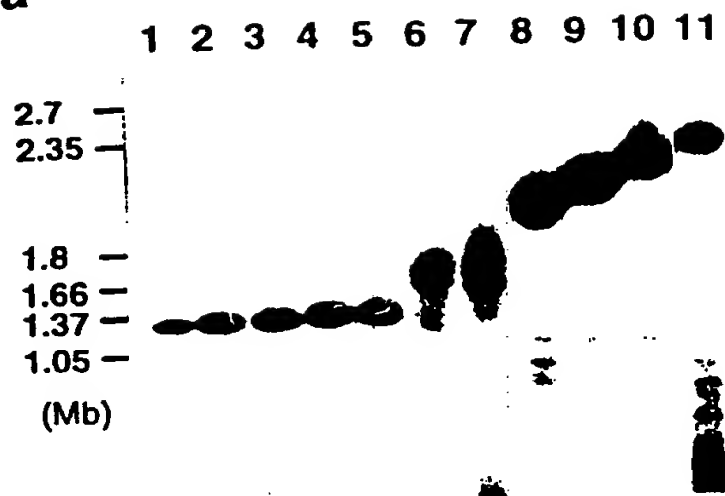


【図 4】

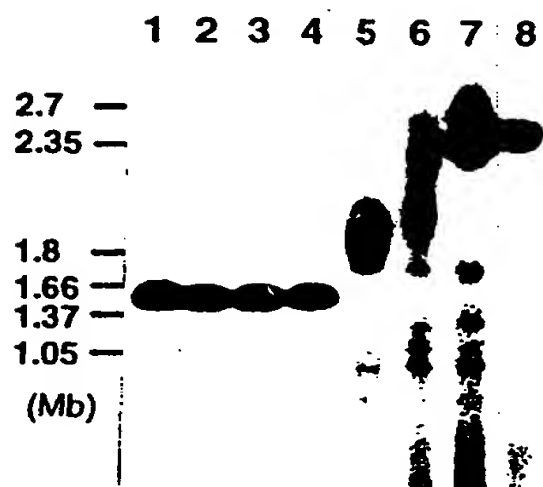


【図 5】

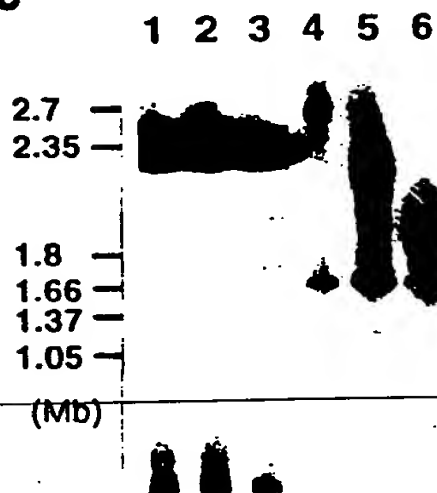
a



b



c



【図 6】

a



NOY408-1a

b



NOY408-1af

c



NOY408-1af
(YEp-*FOB1*)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 遺伝子組換えによる蛋白質の生産性を向上させるため、増幅遺伝子を安定に保持し、導入遺伝子を安全かつ確実に多コピー数増幅することが可能な組換え遺伝子増幅方法が求められている。

【解決手段】 組換えのホットスポット領域および自律複製配列を、組換え導入された外来遺伝子に近接して配置し、複製フォークの進行を阻害する活性を有する蛋白質を存在させることにより、外来遺伝子を増幅させる方法に関する。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 598142003
【住所又は居所】 愛知県岡崎市戸崎町藤挟 20 - 4
【氏名又は名称】 堀内 嵩

【特許出願人】

【識別番号】 000001029
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号
【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】 100106574
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号 協和醗酵工
業株式会社 知的財産部
【氏名又は名称】 岩橋 和幸

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001029]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

氏 名 協和醗酵工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [598142003]

1. 変更年月日 1998年10月15日
[変更理由] 新規登録
住 所 愛知県岡崎市戸崎町藤挟20-4
氏 名 堀内 嵩